

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-072204

(43)Date of publication of application : 23.03.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 03-262902

(71)Applicant : SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 12.09.1991

(72)Inventor : TANAKA SATOSHI

(54) METHOD FOR HIGHLY-SENSITIVE MEASUREMENT OF SPECIFIC ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a method for a simple and highly-sensitive assay of a specific antibody.

CONSTITUTION: In a sandwich immunoassay of a specific antibody, a tagged antigen (X) and an antigen (Y) combined with a carrier in an amount being 20 to 100 times as larger as the one of (X) are added simultaneously to a liquid to be tested which contains a specific antibody to be measured, so that a complex of X-antibody-Y be formed, and a tage on the carrier is determined. After the complex on a solid phase is washed, besides, the tagged antigen (X) is added again, so that the lowering (a prozone phenomenon) of a measured value in a zone of excessive antibodies be eliminated.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

17.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3162438

[Date of registration]

23.02.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

BEST AVAILABLE COPY

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

23.02.2004

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-72204

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl.⁵

G 0 1 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

N 7906-2J

審査請求 未請求 請求項の数5(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平3-262902

(22)出願日 平成3年(1991)9月12日

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 田中 聡

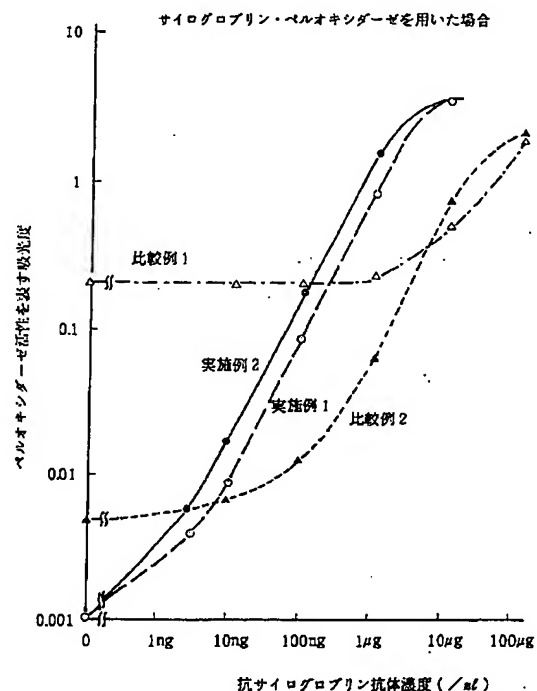
大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

(54)【発明の名称】 高感度特異的抗体測定法

(57)【要約】

【目的】 簡便かつ高感度の特異的抗体アッセイ法を提供する。

【構成】 測定すべき特異的抗体を含む被験液に、標識化抗原(X)とその20~100倍量の担体に結合させた抗原(Y)を同時に添加し、X-抗体-Yなる複合体を形成させ、担体上の標識を定量する特異的抗体のサンドイッチイムノアッセイ。また固相上の複合体を洗浄後、再度標識化抗原(X)を添加し、抗体過剰域での測定値の低下(プロゾーン現象)を解消する特異的抗体のサンドイッチイムノアッセイ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の（A）および（B）工程を含む特異的抗体の測定法

工程（A）：予め標識化した抗原および予め担体と結合させた抗原を同時に被検液に加え、担体・抗原-測定すべき特異的抗体-抗原・標識なる複合体を形成させる工程。

工程（B）：被検液から担体を分離し、洗浄してから担体上の複合体を測定する工程。

【請求項2】工程（A）において、担体に結合させた抗原と標識化抗原のモル比が100：1～20：1の範囲にある請求項1記載の測定法。

【請求項3】工程（A）において、担体に結合させた抗原がキャリアを介して結合していることを特徴とする請求項1記載の測定法。

【請求項4】下記の（A'）、（B'）および（C'）工程を含む特異的抗体の測定法。

工程（A'）：予め標識化した抗原およびその20～100倍モルの予め担体に結合させた抗原を同時に被検液に加え、担体・抗原-測定すべき特異的抗体-抗原・標識なる複合体を形成させる工程。

工程（B'）：担体を被検液から分離してから標識化抗原を添加する工程。

工程（C'）：担体を分離、洗浄してから担体上の複合体を測定する工程。

【請求項5】工程（B'）において、添加する標識化抗原の量を工程（A'）における標識化抗原の量以下にすることを特徴とする請求項4記載の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗原特異抗体の高感度測定法に関する。

【従来の技術】特異的抗体定量のためのサンドイッチイムノアッセイとして従来より、抗原と抗抗体を担体と標識に結合させる方法があった。しかし、これらの方法は抗抗体の特異性が低いために感度を上げにくい欠点を有していた。これを改善するため、近年、抗原で特異抗体をはさむ方法が開発されている。即ち、標識化抗原とハプテン結合抗原と被検液中の特異抗体の三種で液相中、複合体を形成させた後、これを抗ハプテン抗体で担体上にトラップして測定する方法が報告されている〔石川ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス（J. Clin. Lab. Anal.）、第3巻、第252頁、（1989）〕。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】上記の技術により、飛躍的に高感度化がなされたが、標識化抗原（X）と担体結合にかかわる抗原（Y）を同時に被検液に添加するため測定条件設定が難しく、特に抗体大過剰の状態では抗原（X）-抗体-抗原（Y）という複合体の形成が阻害

されて、かえって測定値が低くなるいわゆるプロゾーン現象が起こる欠点があった。本発明の目的は、より簡便な高感度アッセイ法を確立すると共に、プロゾーン現象を解消する改良法を提供することにある。

【0003】

【課題を解決するための手段】発明者は、特定比率の標識化抗原（X）と担体結合抗原（Y）を同時に被検液に添加することによって、石川らの方法よりさらに簡便な方法で同程度高感度にアッセイができること、ならびに、担体洗浄後に再度標識化抗原を系に添加することにより、プロゾーン現象を解消できることを見出し、本発明を完成した。

【0004】即ち、本発明は、下記の（A）および（B）工程を含む特異的抗体の測定法である。

工程（A）：予め標識化した抗原および予め担体と結合させた抗原を同時に被検液に加え、担体・抗原-測定すべき特異的抗体-抗原・標識なる複合体を形成させる工程。

工程（B）：被検液から担体を分離し、洗浄してから担体上の複合体を測定する工程。

【0005】以下、本発明について工程順に説明する。

工程（A）について

被検液としては、例えば、血清、血漿、髄液、唾液、尿等の体液、緩衝液が挙げられる。測定すべき特異的抗体としては、実質上、従来の免疫学的測定法で測定し得た全ての抗体が挙げられる。例を挙げれば、抗核抗体、抗DNA抗体抗ENA抗体、リウマトイド因子、抗赤血球抗体、抗ミトコンドリア抗体、抗筋抗体、抗甲状腺抗体（抗ミクロソーム抗体、抗サイログロブリン抗体、抗TSHレセプター抗体）、抗インスリン抗体、抗インスリンレセプター抗体、抗アセチルコリンレセプター抗体等の自己抗体やウイルス、微生物に対する抗体、インターフェロンやヒト成長ホルモン等の蛋白製剤に対する抗体、アレルギー疾患におけるアレルギー抗体等である。これら抗体は被検液中で遊離した状態のみではなく免疫複合体、結合蛋白と結合した状態でも測定可能である。

【0006】本発明で言う抗原とは、測定すべき抗体と抗原抗体反応を生じうる特異抗原、イディオタイプ抗体のような成分をいう。

【0007】標識を結合した抗原における標識としては、免疫学的測定において測定に利用されるいずれの物質でもよく、酵素、放射性物質、発光物質、蛍光物質、金属化合物等が挙げられる。例えば、酵素ではペルオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、放射性物質としてはヨウ素、水素、蛍光物質としては、フルオレセインインソシアネート、発光物質としては、アクリジウム塩、金属化合物としては、ユーロピウム（Eu³⁺）等が挙げられる。これらの標識は、（A）から（B）の工程に影響を及ぼさないキャリアを介在させて抗原に結合させてもよい。抗原が低分

子の場合には、特にこの様な介在が好ましい。キャリアーとしては、例えば非特異ウサギ IgG、ウシ血清アルブミン、デキストラン等が挙げられる。標識を結合させる方法としては、従来免疫学的測定法において、抗体、抗原に標識を結合するいずれの結合方法でもよい。

【0008】担体は、本発明の目的をそこなわない限り、特に制限はなく、従来免疫学的測定法において使用されているものを使用すれば十分である。例えば、ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス、アガロース等が挙げられる。また、その形状にも特に制限はない。担体への抗原の結合は、免疫学的測定における担体作成の公知の方法で行われる。抗原が低分子の場合、これら結合は(A)から(B)の工程に影響を及ぼさないキャリアーを介在させて担体に結合させる。キャリアーとしては、非特異ウサギ IgG、ウシ血清アルブミン、デキストラン、あるいはハプテンと抗体、ビオチンとアビジンなどが挙げられる。

【0009】工程(A)における被検液中の特異抗体と標識化抗原と担体に結合した抗原とからなる複合体の担体上での形成は、通常の抗原抗体反応に用いられる条件下に行われる。一般には、 $0\sim 45^{\circ}\text{C}$ 、数時間～数10時間、好ましくは $20\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、 $1\sim 6$ 時間で複合体が形成される。

【0010】系に加える標識化抗原の量は、被検液中の抗体との反応速度が、抗体と担体に結合した抗原との反応速度とほぼ等しくなるような条件に設定する。通常の免疫学的測定の場合では、標識化抗原の量は、担体に結合した抗原の量に対して分子モル比で $1/100\sim 1/20$ となる。

【0011】工程(B)について

被検液と担体とを分離する方法としては、従来担体を用いた免疫学的測定法で用いられるいずれの方法でもよい。担体に結合した複合体を測る工程に移る前に担体を洗浄するのが好ましい。洗浄は、サンドイッチ法で通常用いられる条件で行えばよい。洗浄液を加えた後、数分間インキュベーションした後洗浄液を除去するのが好ましい。担体に結合した複合体を測定するには(A)の工程で記した抗原に導入した標識を測定する公知の方法が挙げられる。

【0012】本発明はまた、下記の(A')、(B')および(C')工程を含むさらに改良された特異的抗体の測定法に関する。

工程(A')：予め標識化した抗原およびその $20\sim 100$ 倍モルの予め担体に結合させた抗原を同時に被検液に加え、担体・抗原-測定すべき特異的抗体-抗原・標識なる複合体を形成させる工程。

工程(B')：担体を被検液から分離してから標識化抗原を添加する工程。

工程(C')：担体を分離、洗浄してから担体上の複合体を測定する工程。

工程(A')および工程(C')はそれぞれ前に述べた工程(A)および工程(B)と同じである。

【0013】工程(B')は、プロゾーン現象を解消するために設けられたステップであり、本発明に特徴的な工程である。即ち、(A')、(C')のみではもし被検液中の抗体量が担体に結合した抗原量に比し過剰になっているとき、この過剰量の抗体は、担体に結合できないが標識化抗原を消費するので、標識化抗原は、担体に結合した抗体量に比し不足することになり、結果として担体に結合した抗体の量についての測定値は実際の量より低めにでることになる。そこで本工程により被検液中の過剰量の抗体により消費された標識化抗原を補うことによって担体に結合した抗体の量を正しく測ることができる。

【0014】被検液と担体とを分離する方法としては、従来担体を用いた免疫学的測定法で用いられるいずれの方法でもよい。担体に結合した複合体を測る工程に移る前に担体を洗浄するのが好ましい。洗浄は、サンドイッチ法で通常用いられる条件で行えばよい。

【0015】工程(B')における標識化抗原の量は特に規定されないが、過剰量の添加は担体への非特異的結合を増加させ、バックグラウンドを上昇させることによる感度の低下につながるもので、反応を完了させるに十分なできるだけ少ない量を用いるのが好ましい。通常には、工程(A')に用いた量の 10 分の 1 から等量の範囲である。工程(B')における標識化抗原と担体上の不完全な複合体との反応は、通常の抗原抗体反応に用いられる条件下に行われる。一般には、 $0\sim 45^{\circ}\text{C}$ 、数 10 分～数時間、好ましくは $20\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、 30 分～ 2 時間で複合体が形成される。

【0016】以下、本発明を実施例で説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

【実施例】

実施例1

【サイログロブリンの精製】ヒトサイログロブリン(UCBバイオプロダクツ社、ベルギー) 10mg をDE-52セルロース(ワットマン社、ケント州、イギリス)カラムを用いる方法[大滝ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボライト(J. Clin. Endocrinol. Metab.)第52巻、第239頁(1981)]にて精製した。更に上述の精製サイログロブリン 7.0mg をウサギ(抗ヒトIgG γ 鎖)IgG不溶化セファロース4Bカラム($1.0\times 4.5\text{cm}$)を用いて、 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、 $\text{pH}7.0$ で溶出した。次いでウルトログルAcA22(LKB、ストックホルム、スウェーデン)($1.6\times 4.5\text{cm}$)を用い、同緩衝液でゲル濾過を行った。精製の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。サイログロブリンの濃度は、 280nm の吸光度から吸光係数 $1.01/\text{g}\cdot\text{cm}$ として求めた。

【0017】サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製

1. メルカプトサクシニル-サイログロブリンの調製
精製サイログロブリンにS-アセチルメルカプトサクシニク・アンハイドライドを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ (J. Immunology assay)、第4巻、第209頁 (1983)〕によりチオール基を導入した。サイログロブリン1分子あたり導入されたチオール基の数は3.8個であった。

2. マレイミド-ペルオキシダーゼの調製

N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを用いる公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・アプライド・バイオケミストリー (J. Appl. Biochem.)、第6巻、第56頁 (1984)〕により、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼにマレイミド基を導入した。導入されたマレイミド基の数は、ペルオキシダーゼ1分子あたり1.3個であった。

3. サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製

メルカプトサクシニル-サイログロブリン310 μ gを溶解した5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0、70 μ lとマレイミド-ペルオキシダーゼ93 μ gを溶解した5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0、5 μ lとを4 $^{\circ}$ Cにて20時間反応させた。反応液はウルトロゲルAcA22カラム (1.6 \times 45cm) を用い、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5によりゲル濾過を行った。サイログロブリン1分子あたり導入されたペルオキシダーゼの数は1.7個であった。

【0018】サイログロブリン- β -D-ガラクトシダーゼの調製

1. マレイミド-サイログロブリンの調製

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0 (2.0ml) に溶解した精製サイログロブリン (1.08mg) にジメチルホルムアミドに溶解した0.55mMのN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート (0.2ml) を加え、30 $^{\circ}$ Cにて30分間反応させた。反応後、5mMのEDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0で平衡化したセファデックスG-25カラム (1 \times 30cm) を用いてゲル濾過を行い、マレイミド化サイログロブリンを得た。サイログロブリンに導入されたマレイミド基は1分子あたり4個であった。

2. サイログロブリン- β -D-ガラクトシダーゼの調製

5mMのEDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0 (50 μ l) に溶解したマレイミド化サイログロブリン (0.55mg) に同緩衝液 (85 μ l) に溶解した β -D-ガラクトシダーゼ (0.45mg) を加え、4 $^{\circ}$ C、2時間反応させた。反応液は、0.1Mの塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミ

ン、0.1mMのMgCl₂ および0.1%NaN₃ を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で平衡化したウルトロゲルAcA22カラム (1.6 \times 70cm) を用いてゲル濾過を行い、サイログロブリン- β -D-ガラクトシダーゼを得た。導入された β -D-ガラクトシダーゼはサイログロブリン1分子あたり1個であった。

【0019】サイログロブリン不溶性固相の調製 精製サイログロブリン溶液 (0.01g/l) を用いてマイクロプレート (33mm² \times 11.3mm、マキシソープF8 (ヌンク社、デンマーク)) の各ウェル表面上に公知の方法で〔石川ら、スカンジナビヤン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Scand. J. Immunol.)、第8巻 (補7)、第43頁 (1978)〕物理的吸着により不溶化した。

【0020】ペルオキシダーゼ活性の測定 各ウェルに基質溶液 (0.017%過酸化水素、0.6mg/ml オルトフェニレンジアミンを含む0.05Mリン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液、pH4.8) を150 μ l加え、室温で30分静置した後、50 μ lの2N硫酸で反応を停止した。各ウェル中の反応液の492nmの吸光度を測定することによって結合したペルオキシダーゼの活性を求めた。

【0021】 β -D-ガラクトシダーゼ活性の測定

β -D-ガラクトシダーゼ活性は、4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトシドを基質として、室温、30分間の反応で測定した〔今川ら、アナリス・クリニカル・バイオケミストリー (Ann. Clin. Biochem.)、第21巻、第310頁 (1984)〕。蛍光光度は、10⁻⁸Mの4-メチルウンベリフェロンを溶解した0.1Mグリシン-NaOH緩衝液、pH10.3を標準として測定した。

【0022】ヒト抗サイログロブリン抗体の測定 予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0.05mlと、サイログロブリン-ペルオキシダーゼ (あるいはサイログロブリン- β -D-ガラクトシダーゼ) 100fmol、0.55M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび1.5%Tween 20を含む、0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.1mlとをサイログロブリン不溶性プレートの各ウェル内に添加し室温で3時間静置して反応させた。各ウェルを0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.3mlで3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ (あるいは β -D-ガラクトシダーゼ) 活性を測定した。結果を図1及び図2に示す。

【0023】実施例2

サイログロブリンの精製、サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製、サイログロブリン- β -D-ガラクト

シダーゼの調製、ペルオキシダーゼ活性の測定 β -D-ガラクトシダーゼ活性の測定は、実施例1の方法に従った。

【0024】〔ジニトロフェニルサイログロブリン結合ウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) I g G不溶化固相の調製〕

1. ウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) I g G不溶化固相の調製
ウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) 抗血清 (生化学工業、東京) 4. 23 gに0. 747 gの硫酸ナトリウムを少しずつ加え、室温、30分間攪拌した後、10, 000×gで15分間遠心した。沈澱を4. 0 mlの0. 0175 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6. 3、に溶解し、同緩衝液で透析した後、DE-52セルロース (ワットマン、ケント州、イギリス) カラム (1. 6×8. 0 cm) を用いて、塩化ナトリウムの直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。次いで、この溶液を用いてマイクロプレート〔33 mm²×11. 3 mm、マキシソープF8 (ヌンク社、デンマーク)〕表面上に公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (前出)〕で、物理的吸着により不溶化した。

【0025】2. ジニトロフェニルサイログロブリンの調製

(1) サクシニミジル-2, 4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸の合成

2, 4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸 (シグマ社、ミズーリ州) と、N-ヒドロキシサクシニミド (和光純薬工業、大阪) をジクロロカルボジイミド (和光純薬工業) により縮合される公知の方法〔F. レビ・シェーファー (F. levi-schaffer) ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・トロピカル・メディスン・アンド・ハイジーン (Am. J. Trop. Med. Hyg.)、第32巻、第343頁 (1983)〕によりサクシニミジル-2, 4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸を合成した。次いで、シリカゲル (40 g) カラムを用い、クロロホルム/メタノール〔40/1 (V/V)〕の系で精製を行った後NMR (核磁気共鳴法) および質量スペクトル法により構造を確認した。

(2) ジニトロフェニルサイログロブリンの調製

精製サイログロブリン0. 5 mgを溶解した0. 1 Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 7. 0、0. 6 mlに、(1) で調製したサクシニミジル-2, 4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸66 nmolを含むN, N-ジメチルホルムアミド60 μlを加え、30°C、30分反応させた。反応後、セファデックスG-25 (ファルマシア、スウェーデン) カラム (1. 0×30 cm) を用い、0. 1 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0でゲル濾過を行った。サイログロブリン1分子あたり導入されたジニトロフェニル基の数は、11個であった。ジニ

トロフェニル基の定量は、360 nmの吸光度から吸光係数17400/M・cmとして求めた。

【0026】3. ジニトロフェニルサイログロブリン結合ウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) I g G不溶化固相の調製

1. で調製したウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) I g G不溶化固相に、2. で調製したジニトロフェニルサイログロブリン500 fmolを溶解した0. 1 M塩化ナトリウム、0. 1%ウシ血清アルブミンおよび0. 1%アジ化ナトリウムを含む0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0、0. 15 mlを添加し、4°Cで16時間反応させた。反応後、同緩衝液で洗浄し、0. 3 mlを添加した状態で保存した。

【0027】〔ヒト抗サイログロブリン抗体の測定〕 予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を、健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0. 05 mlと、サイログロブリン-ペルオキシダーゼ (あるいはサイログロブリン-β-D-ガラクトシダーゼ) 100 fmol、0. 55 M塩化ナトリウム、0. 1%ウシ血清アルブミン、および1. 5% Tween 20を含む、0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0、0. 1 mlとを、ジニトロフェニルサイログロブリン結合ウサギ (抗ジニトロフェニルウシ血清アルブミン) I g G不溶化プレートの各ウェル内に添加し、室温で3時間静置して反応させた。各ウェルを0. 1 M塩化ナトリウムを含む0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0、0. 3 mlで3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ (あるいはβ-D-ガラクトシダーゼ) 活性を測定した。結果を図1及び図2に示す。

【0028】比較例1

サイログロブリンの精製、サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製、サイログロブリン不溶化固相の調製、ペルオキシダーゼ活性の測定は実施例1の方法に従った。

〔ヒト抗サイログロブリン抗体の測定〕 予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を、健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0. 05 ml、0. 55 M塩化ナトリウム、0. 1%ウシ血清アルブミン及び1. 5% Tween 20を含む0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0、0. 1 mlとをサイログロブリン不溶化プレートの各ウェル内に添加し室温で2時間静置して反応させた。各ウェル内を0. 1 M塩化ナトリウムを含む0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0で2回洗浄した後ペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒトI g G (カッペル社、メリーランド州) 7. 5 ng、0. 1 M塩化ナトリウム、0. 1%ウシ血清アルブミン及び1% Tween 20を含む0. 01 Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 7. 0、0. 15 mlを添加し、室温で2時間静置して反応させ

た。各ウェルを上記洗浄液で3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ活性を測定した。結果を図1に示す。

【0029】比較例2

サイログロブリンの精製、サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製、サイログロブリン-β-D-ガラクトシダーゼの調製、サイログロブリン不溶化固相の調製、ペルオキシダーゼ活性の測定、β-D-ガラクトシダーゼ活性の測定は実施例1の方法に従った。

〔ヒト抗サイログロブリン抗体の測定〕予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を、健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0.05mlと0.55M塩化ナトリウム0.1%ウシ血清アルブミン及び1.5%Tween 20を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.1mlとをサイログロブリン不溶化プレートの各ウェル内に添加し、室温で2時間静置して反応させた。各ウェルを0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で2回洗浄した。各ウェルにサイログロブリン-ペルオキシダーゼ（あるいはサイログロブリン-β-D-ガラクトシダーゼ）100fmol、0.1M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび1%Tween 20を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.15mlを添加し室温で2時間静置して反応させた。各ウェルを上記洗浄液で3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ（あるいはβ-D-ガラクトシダーゼ）活性を測定した。結果を図1及び図2に示す。

【0030】実施例3

サイログロブリンの精製、サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製、サイログロブリン不溶化固相の調製、ペルオキシダーゼ活性の測定は実施例1の方法に従った。

〔ヒト抗サイログロブリン抗体の測定〕予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を、健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0.05mlと、サイログロブリン-ペルオキシダーゼ100fmol、0.55M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび1.5%Tween 20を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH、7.0、0.1mlとをサイログロブリン不溶化プレートの各ウェル内に添加し室温で2時間静置して反応させた。各ウェルを0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.3mlで1回洗浄した後、サイログロブリン-ペルオキシダーゼ50fmol、0.1M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび1%Tween 20を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩

衝液、pH7.0、0.15mlを加え室温で1時間静置して反応させた。各ウェルを上記洗浄液で3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ活性を測定した。結果を図3に示す。

【0031】比較例3

サイログロブリンの精製、サイログロブリン-ペルオキシダーゼの調製、ペルオキシダーゼ活性の測定は実施例1の方法に、ジニトロフェニル-サイログロブリンの調製、ウサギ（抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG不溶化固相の調製は実施例2の方法にそれぞれ従った。

〔ヒト抗サイログロブリン抗体の測定〕予め抗サイログロブリン抗体濃度を定量したバセドー病患者の血清を、健常者の血清で種々の濃度に希釈した検体0.05mlとサイログロブリン-ペルオキシダーゼ、ジニトロフェニル-サイログロブリンともに100fmol、0.55M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび1.5%Tween 20を含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、0.1mlとを、抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンIgG不溶化プレートの各ウェルに添加し室温で3時間静置して反応させた。ウェル内を0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0で3回洗浄した後、固相に結合したペルオキシダーゼ活性を測定した。結果を図3に示す。

【0032】

【発明の効果】本発明の測定法によれば、従来の抗原と抗体とでサンドイッチする測定法（比較例1）に比して約100倍、抗原と抗原とで2ステップでサンドイッチする測定法（比較例2）に比して約10倍高感度であり、また標識抗原を再添加する系では、従来の高感度測定法（比較例3）の有していたプロゾーン現象という問題を解消することができた。

【図面の簡単な説明】

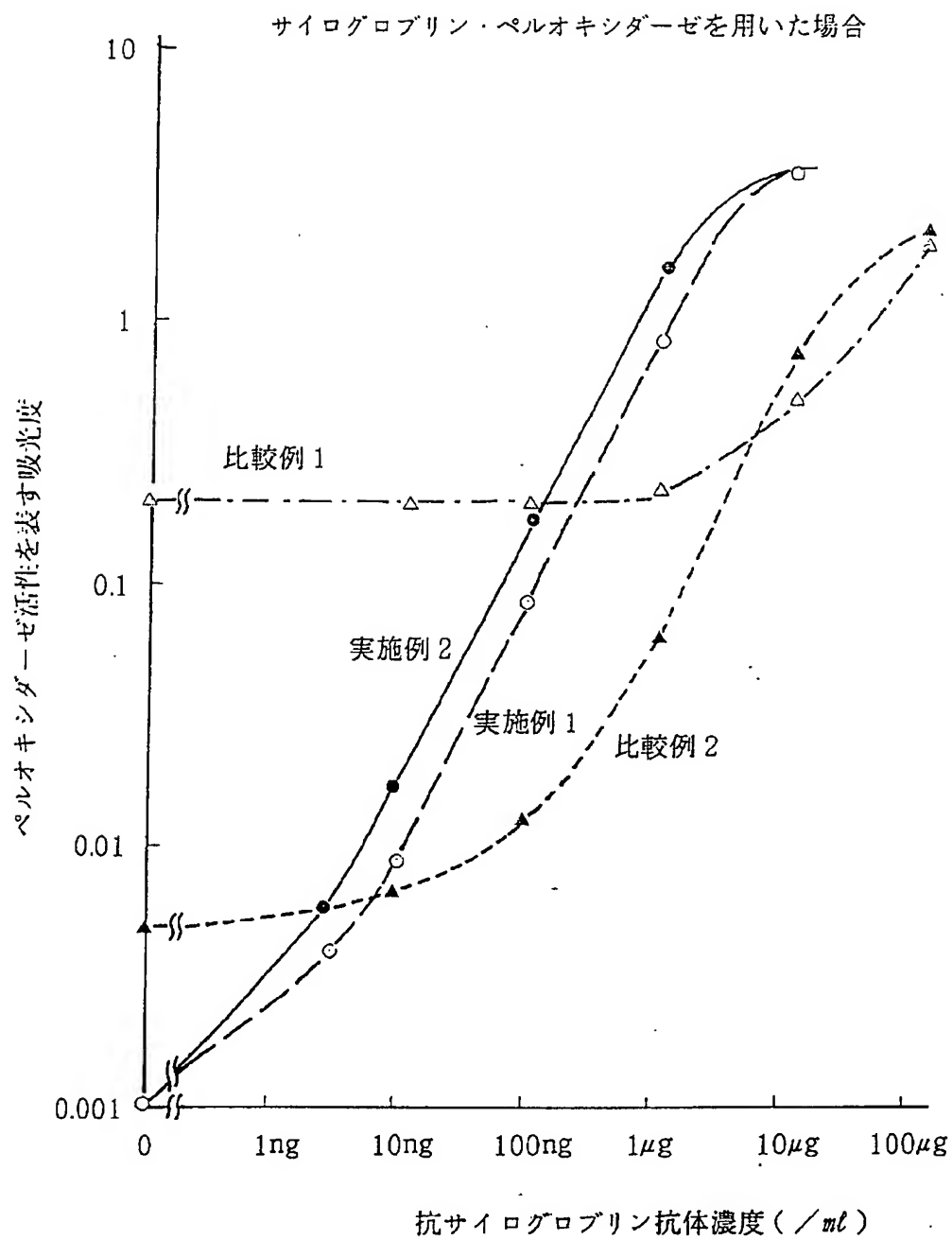
図1～図3は、すべて抗サイログロブリン抗体の検量曲線を示したものであり、横軸は検体中の抗サイログロブリン抗体の濃度、縦軸は各固相に結合した標識酵素の活性に由来するシグナル量を示している。

【図1】図1の各曲線は、実施例1、2および比較例2のサイログロブリン-ペルオキシダーゼを標識化抗原として用いた場合、ならびに比較例1を表す。

【図2】図2の各曲線は、実施例1、2および比較例2のサイログロブリン-β-D-ガラクトシダーゼを標識化抗原として用いた場合を表す。

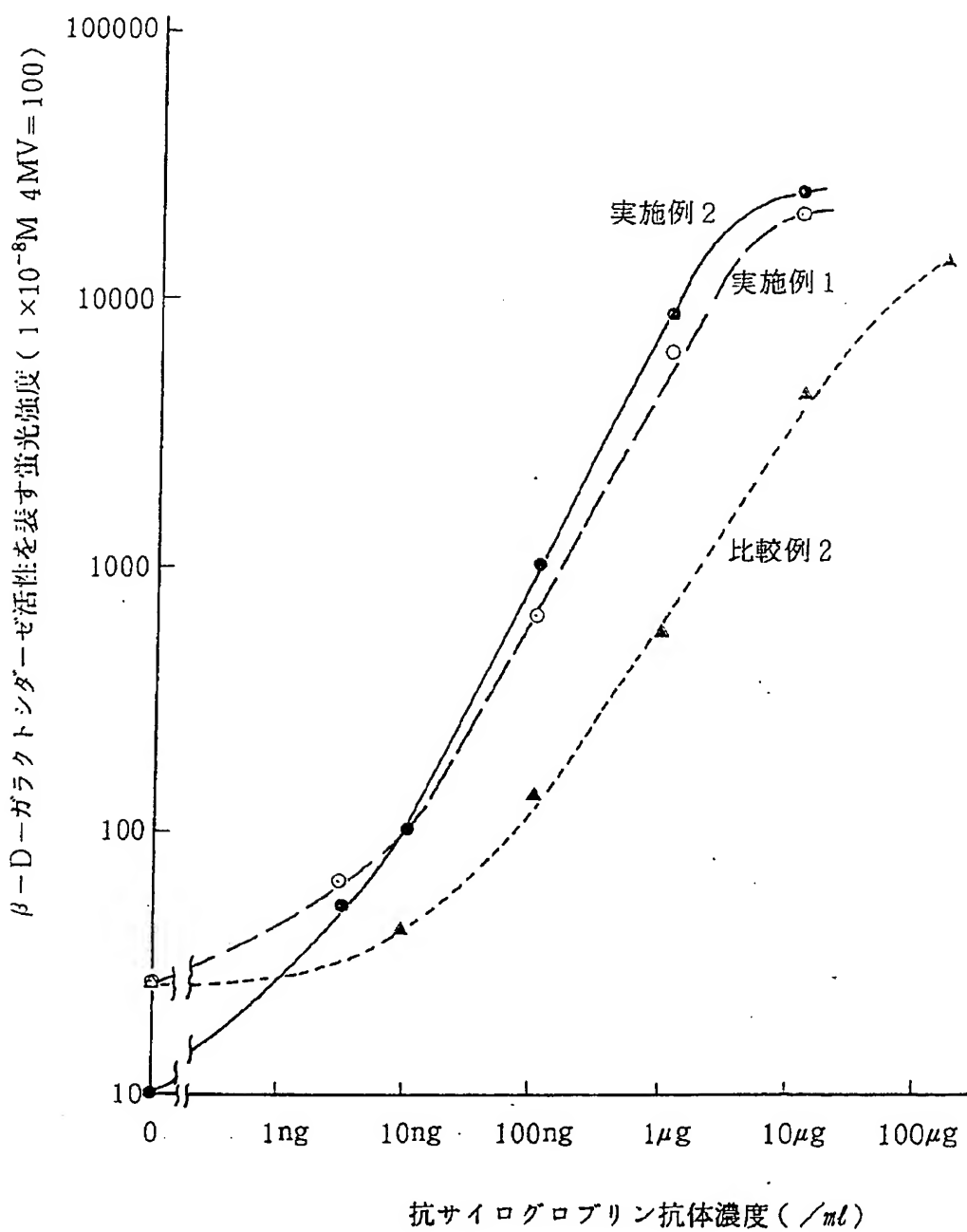
【図3】図3の各曲線は、実施例3および比較例3をそれぞれ表すものである。

【図1】

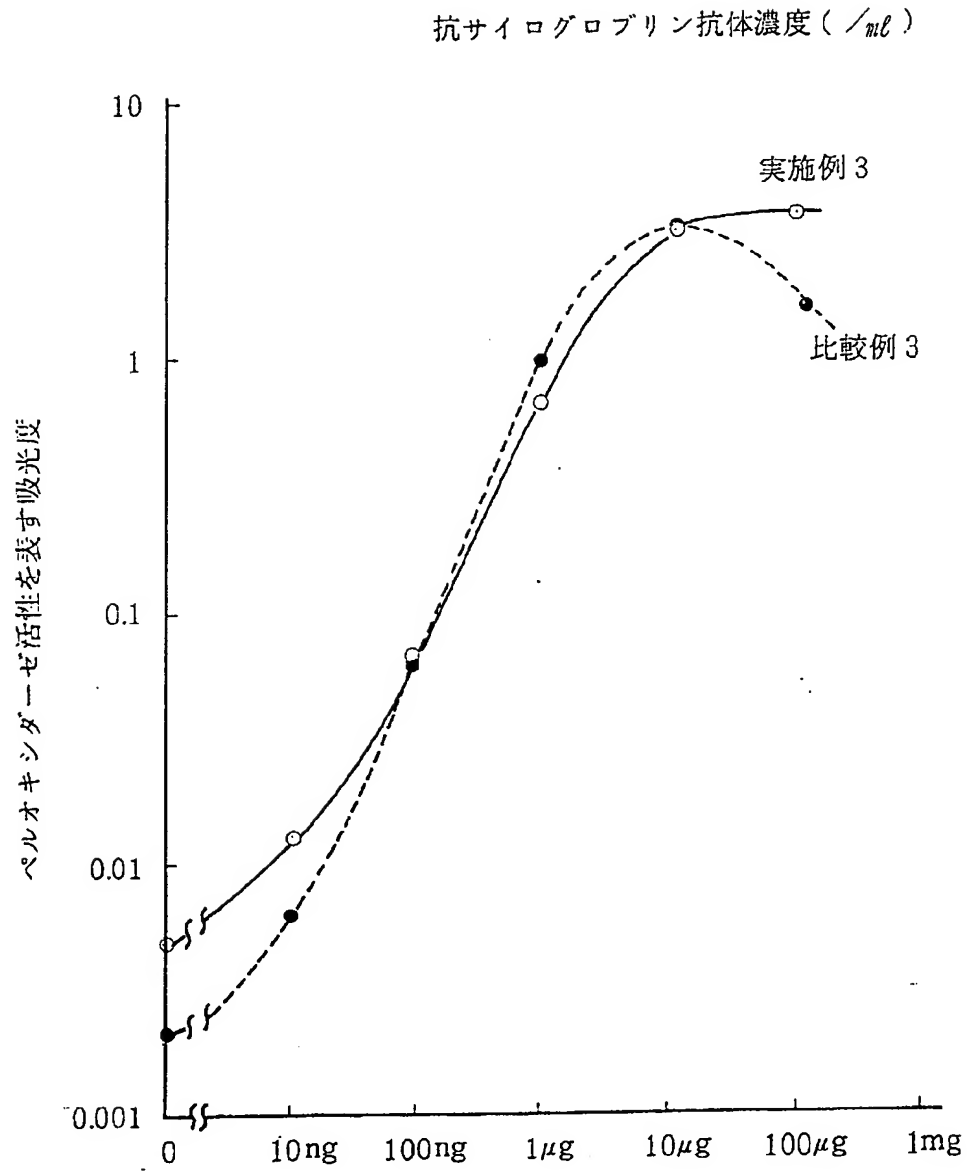


【図2】

サイログロブリン- β -D-ガラクトシダーゼを用いた場合



【図3】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.